



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

RECEIVED 18 OCT 2004

PCT/EP 03/04002

14-05-03

511656

REC'D 11 JUN 2003

WIPO

PC

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

02008761.5



**BEST AVAILABLE COPY**

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

R C van Dijk



Europäisches  
Patentamt

Euro  
Patent Office

Office européen  
des brevets

PC1/EP 03 / 04 002  
44-05-03

Anmeldung Nr:  
Application no.: 02008761.5  
Demande no:

Anmeldetag:  
Date of filing: 18.04.02  
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Lynkeus Bio Tech GmbH  
Science Park Würzburg,  
Friedrich-Bergius-Ring 15  
97076 Würzburg  
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:  
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.  
If no title is shown please refer to the description.  
Si aucun titre n'est indiqué se referer à la description.)

Komponenten und Verfahren zur spezifischen Hemmung von Genen in Augenzellen

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)  
revendiquée(s)  
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/  
Classification internationale des brevets:

A61K48/00

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten/Contracting states designated at date of  
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE TR

18 April 2002

## Komponenten und Verfahren zur spezifischen Hemmung von Genen in Augenzellen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren, Nukleinsäuren, Organismus, Wirt,  
5 Zelle, Zelllinien, Gewebe, Organe, pharmazeutische Zusammensetzung bzw. Medikament, Träger, Vektor zur spezifischen Hemmung von Genen in Zellen und Geweben, insbesondere die sich innerhalb des Auges jenseits der Blut/Retina-Schranke befinden und in den betreffenden Zellen und Geweben spezifisch oder überwiegend exprimiert werden.

10

Das menschliche Auge ist ein Organ außerordentlicher Komplexität, dessen Strukturen und Gewebe in ihren jeweils spezifischen Funktionen so aufeinander abgestimmt sind, dass der Vorgang des Sehens vom Eintreffen des Lichtstrahles auf die Linse bis zur Umwandlung in elektrische Impulse und deren Weiterleitung  
15 in die für die bewusste Wahrnehmung zuständigen Bereiche des Gehirns optimal gewährleistet wird. Insbesondere die Gewebe des Augenhintergrundes wie die mehrschichtige Retina, in der funktionell hochspezialisierte Zelltypen die Umwandlung von Lichtenergie in elektrische Impulse vermitteln, und auch das Retinale Pigmentepithel (RPE) zeichnen sich durch eine sehr hohe  
20 Stoffwechselaktivität aus. Die aktive Versorgung der Photorezeptoren mit Nährstoffen aus dem Blutkreislauf und der gleichzeitige Abtransport und die Prozessierung von Abbauprodukten des Sehvorganges erfolgt über das RPE, welches wiederum durch die Bruchsche Membran von den Blutgefäßen der Choriokapillaris getrennt ist. Der Stoffaustausch über das RPE und die Bruchsche  
25 Membran erfolgt kontrolliert und spezifisch und aufgrund dieser funktionellen Analogie zur Blut/Hirn-Schranke spricht man hier von der Blut/Retina-Schranke. Die Aktivität zahlreicher, oft spezifisch exprimierter Gene ist zur Kontrolle und Durchführung des Phototransduktionsprozesses in den Zellen der Retina und des Stoffaustausches über die Blut/Retina-Schranke, darüber hinaus aber auch zur  
30 Aufrechterhaltung der Struktur und funktionellen Integrität der zahlreichen Komponenten der Gewebe des Augenhintergrundes notwendig. Dieses einzigartige und hochentwickelte System ist daher sehr anfällig für zahlreiche genetische Defekte, die sich in einer großen phänotypischen Bandbreite retinaler

Erkrankungen äußert.

Neben der Chorioretinitis und der Herpesretinitis, die als erworbene Formen retinaler Erkrankungen betrachtet werden können, lässt sich die überwiegende  
5 Zahl retinaler Krankheitsbilder auf eine genetische Disposition zurückführen. Dazu gehören beispielsweise die primäre Netzhautablösung (Ablatio retinae), das Retinoblastom, das retinale Astrocytom (Bourneville Pringle), Angiomatosis retinae (Hippel-Lindau), die Coats-Erkrankung (Retinitis exsudativa), die Eales Erkrankung, Retinopathia centralis serosa, Okulärer Albinismus, Retinitis  
10 pigmentosa, Retinitis punctata albescens, das Usher Syndrom, die Lebersche Kongenitale Amaurose, die Zapfendystrophie, die Vitelliforme Makula-Degeneration (Morbus Best), die Juvenile Retinoschisis, die North Carolina Macula-Dystrophie, die Sorsby Fundus-Dystrophie, die Doyme'sche Honigwaben Retinal-Dystrophie (Malattia leventinese), Morbus Stargardt, die Wagnersche  
15 Vitreoretinale Degeneration und die Altersbedingte Makula-Degeneration (AMD).

Während es bei der Aufklärung der Ursachen monogener Retinopathien wie Morbus Best oder Morbus Stargardt in letzter Zeit beeindruckende Fortschritte gab, ist der heutige Kenntnisstand über die oft komplexen molekularen  
20 Stoffwechselzusammenhänge, welche dem charakteristischen Krankheitsbild multifaktoriell bedingter retinaler Erkrankungen zugrundeliegen, nur sehr gering. Im Folgenden wird exemplarisch auf die AMD als komplexe Augenerkrankung mit genetischer Komponente und den damit zusammenhängenden technischen Problemen in Bezug auf die Erforschung der molekularen Ursachen und der  
25 Entwicklung diagnostischer und pharmakologischer Interventionsstrategien eingegangen werden.

Bei der AMD, die zu den retinalen Degenerationen gezählt wird, handelt es sich um die häufigste Erblindungsursache im fortgeschrittenen Lebensalter in der  
30 entwickelten Welt. Die Prävalenz steigt von 9% bei Personen in einem Alter von mehr als 52 Jahren bis auf mehr als 25% bei den über 75-Jährigen (Paetkau et al. 1978, Leibowitz et al. 1980, Banks und Hutton 1981, Ghafour et al. 1983, Hyman 1987, Hyman et al. 1983, Grey et al. 1989, Yap und Weatherill 1989, Heiba et al.

1994).

- AMD ist eine komplexe Erkrankung, die sowohl durch endogene, als auch durch exogene Faktoren ausgelöst wird (Meyers und Zachary 1988; Seddon et al. 1997).
- 5 Neben den Umweltfaktoren werden noch verschiedene persönliche Risikofaktoren wie Hypermetropie, helle Haut- und Irisfärbung, erhöhter Serum-Cholesterinspiegel, Bluthochdruck oder Zigarettenrauchen vorgeschlagen (Hyman et al. 1983, Klein et al. 1993, Sperduto und Hiller 1986, The Eye Disease Case-Control Study Group 1992, Bressler und Bressler 1995). Eine genetische
- 10 Komponente als Grundlage der AMD wurde von verschiedenen Gruppen dokumentiert (Gass 1973, Piguet et al. 1993, Silvestri et al. 1994) und führte zu der Hypothese, dass die Krankheit in entsprechend genetisch prädisponierten Personen durch Umwelt- und individuelle Faktoren begünstigt werden kann.
- 15 Aufgrund der Komplexität des Krankheitsbildes kann davon ausgegangen werden, dass die Anzahl der bisher unbekannten Gene groß ist, die, wenn sie mutiert sind, zur Anfälligkeit für AMD beitragen.

- Das technische Problem, das dieser Erfindung zugrundeliegt, besteht nun zum
- 20 einen darin, dass eine gezielte Applikation von Wirkstoffen in das Auge und insbesondere in den Augenhintergrund aufgrund der Struktur des menschlichen Auges aufwendig ist, mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden ist und mit Spätfolgen zu rechnen ist. Eine direkte Applikation beispielsweise durch Injektion in den Augenhintergrund ist für die betroffenen Personen sehr unangenehm,
- 25 insbesondere dann, wenn eine Behandlung mehrmals oder chronisch erforderlich ist. Ferner ist eine direkte Applikation in den Bulbus mit erheblichen Nebenwirkungen bzw. mittelfristig auftretenden Sekundärerkrankungen wie Katarakt und Glaukom verbunden. Eine systemische Applikation zeigt dagegen in der Regel Nebenwirkungen außerhalb des Zielorgans Auge – oft ohne dass der
- 30 Wirkstoff in signifikanten Mengen im Augenhintergrund des inneren Auges nachweisbar ist. Selbst bei ausreichender Targetspezifität, die das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen bei einer systemischen Applikation gering halten würde, bleibt diese Art der Applikation ineffizient, da sich die Zielgewebe und

Zielzellen jenseits der Blut/Retina-Schranke befinden und der Wirkstoff aufgrund der stringenten Aktivität dieser Schranke nicht an seinen Wirkort gelangen kann.

Zur Zeit auf dem Markt verfügbare Medikamente zur Behandlung  
5 ophthalmologischer Erkrankungen stehen daher nahezu ausschließlich zur Behandlung der klinischen Symptome des vorderen Auges zur Verfügung, da hier eine Applikation über Augentropfen relativ leicht möglich ist.

Eine kausale Therapie insbesondere der hinteren Augenabschnitte ist mit  
10 Ausnahme oben beschriebener und mit Nebeneffekten verbundener Injektionen nicht möglich.

Das technische Problem besteht zum anderen in der Schwierigkeit der Anwendung konventioneller experimenteller Strategien zur Identifikation von  
15 Genen, die für retinale Erkrankungen ursächlich sind, und deren Validierung als Targets zur Diagnose und für pharmakologische Interventionsstrategien. Dies gilt insbesondere für die AMD, da bei dieser Erkrankung die Symptome erst spät, in der Regel in der 7. Lebensdekade, auftreten. Das Wissen über pathologische Stoffwechselzusammenhänge aufgrund der eingeschränkten oder fehlenden  
20 Funktion einzelner oder mehrerer dafür ursächlicher Gene etwa bei der AMD oder bei anderen retinalen Krankheitsbildern reicht nach bisherigem Kenntnisstand zur medikamentösen Behandlung solcher Krankheiten nicht aus. Geeignete Tier- oder Zellkulturmodelle für derartige Erkrankungen fehlen auf Grund der Komplexität der Erkrankung und entsprechender einfacher Interventions- und Manipulations-  
25 möglichkeiten am Auge.

Als essentielles Sinnesorgan ist das Auge durch natürliche Barrieren (Tränensekretion, Enzyme, Transportvorgänge, Blut/Retina-Schranke) gegen  
äußere schädliche Einflüsse geschützt, die aber gleichzeitig auch eine Schranke  
30 für die Applikation von Medikamenten darstellen. Wie die Blut/Hirn-Schranke stellt die Blut/Retina-Schranke eine physiologische Barriere für die Aufnahme von Medikamenten in das Augeninnere dar und macht eine pharmakologische Therapie von okulären Erkrankungen nach dem derzeitigen Stand der Technik -

wenn überhaupt - nur sehr schwer möglich. Dies gilt zum Beispiel auch für die Applikation von sogenannten einzelsträngigen Antisinn-Oligonukleotiden für die Inhibition der Expression von Ziel-Genen, deren Anwendung im Auge eine intravitreale Injektion erforderlich macht. Die Überwindung der Blut/Retina-Schranke stellt somit ein technisches Problem bei der Therapie okulärer Erkrankungen durch spezifische Inhibition der Proteinexpression im Augengewege dar.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein verbessertes Verfahren sowie Komponenten zur Behandlung von Augenerkrankungen bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird mit dem entsprechenden Gegenstand der Patentansprüche gelöst.

15

Der Grundgedanke der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur spezifischen Hemmung der Expression von Zielgenen in Zellen und Geweben des Auges mit den folgenden Verfahrensschritten:

- Einführen von ein oder mehreren doppelsträngigen Oligoribonukleotiden (dsRNA) außerhalb der Retina, insbesondere des Auges,
- Hemmung der Expression der korrespondierenden mRNA eines oder mehrerer Zielgene durch RNA-Interferenz,
- Degradation der korrespondierenden mRNA eines oder mehrerer Zielgene
- Bereitstellung und Aufrechterhaltung einer Testzelle oder eines Testgewebes, in der/denen die korrespondierende mRNA eines oder mehrerer Zielgene degradiert ist/sind, und
- Beobachtung und Vergleich des entstandenen Phänotyps der hergestellten Testzelle oder des Testgewebes mit demjenigen einer geeigneten Kontrollzelle oder eines Kontrollgewebes, um Informationen über die Funktionen der Gene zu erhalten.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Medikament bzw. eine pharmazeutische Zusammensetzung, die ein oder mehrere doppelsträngige

Oligoribonukleotide (dsRNA) enthält, die mittels RNA-Interferenz die korrespondierende mRNA eines oder mehrerer Zielgene in der Expression hemmen, deren eingeschränkte Funktionen für eine Augenerkrankung ursächlich sind, und die außerhalb der Blut/Retina-Schranke, insbesondere außerhalb des  
5 Auges, angewendet wird.

Die überraschenden Vorteile der Erfindung sind, dass entgegen der weitläufigen Fachmeinung gezeigt werden konnte, dass erfindungsgemäße Wirkstoffe die Blut/Retina-Schranke als physiologische Barriere überwinden können, so dass  
10 eine systemische oder lokale Applikation außerhalb des Augeninneren für eine gezielte Behandlung einer Krankheit des Augenhintergrundes und damit eine verbesserte Therapie möglich ist.

Gleichzeitig werden die Nebenwirkungen, die mit einer direkten Applikation, z. B.  
15 durch Injektion, aufgrund der Struktur des menschlichen Auges verbunden sind und die für die betroffenen Personen, insbesondere bei mehrmaligen oder chronischen Behandlungen, sehr unangenehm und mit Langzeitfolgen wie z.B. Katarakt und Glaukom verbunden sind, erfindungsgemäß reduziert.

20 Die Lösung des technischen Problems besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens zur spezifischen Intervention in Erkrankungen des Augenhintergrundes auf der molekularen Ebene, ohne dass eine direkte Applikation in den Augenhintergrund notwendig ist. Mit der vorliegenden Erfindung wird das weite, bislang nicht oder nur unzulänglich adressierbare Therapiefeld von Erkrankungen  
25 des Augeninneren und des Augenhintergrundes umfänglich erschlossen. Die Intervention beruht auf einer Hemmung spezifisch oder überwiegend in den Geweben des Auges bzw. Augenhintergrundes exprimierter Gene, dadurch gekennzeichnet, dass die hierzu benötigten Wirkstoffe die Blut/Retina-Schranke überwinden können, so dass eine systemische oder lokale Applikation außerhalb  
30 des Augeninneren für eine gezielte Behandlung einer Krankheit des Augenhintergrundes möglich ist.

Mit der gleichen Methode lassen sich einfach und schnell aussagefähige



Tiermodelle generieren, welche die Symptome der überwiegend genetisch bedingten Erkrankungen des Augeninneren nachbilden. Diese Tiermodelle sind geeignet den Entwicklungsprozeß entsprechender spezifischer Pharmazeutika für die Ophthalmologie zu initiieren und Produkte zu validieren.

5

Weitere Vorteile und bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind der Beschreibung entnehmbar.

10 Die Lösung des dieser Erfindung zugrundeliegenden technischen Problems besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens zur spezifischen Hemmung von Genen, deren aberrante Funktionen ursächlich im Zusammenhang mit monogenen oder mit multifaktoriell bedingten Augenerkrankungen stehen. Hierzu kann beispielsweise die AMD als eine Form einer degenerativen retinalen Erkrankung gezählt werden.

15

Ein Verfahren zur spezifischen Hemmung von Genen durch doppelsträngige Oligoribonukleotide (dsRNA) ist aus der WO 01/75164 bekannt. Die Offenbarung dieser Anmeldung wird hiermit in die vorliegende Beschreibung aufgenommen.

20 In dieser Anmeldung wird beschrieben, dass doppelsträngige Oligoribonukleotide (dsRNA) nach der Einführung in die Zielzellen die spezifische Degradation von mRNA induzieren. Die Spezifität dieses Vorganges wird vermittelt durch die Komplementarität eines der beiden dsRNA-Stränge zur mRNA des Zielgens.

25 Der Prozess des genspezifischen, post-transkriptionellen Abschaltens von Genen durch dsRNA-Moleküle wird als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet. Diese Bezeichnung wurde ursprünglich von Fire und Mitarbeitern geprägt, um die Beobachtung zu beschreiben, dass die Einführung von dsRNA-Molekülen in den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* die Genexpression blockiert (Fire et al., 30 1999). Nachfolgend konnte RNAi auch an Pflanzen, Protozoen, Insekten (Kasschau und Carrington 1998) und kürzlich auch an Säugerzellen gezeigt werden (Caplen et al., 2001; Elbashir et al., 2001). Der Mechanismus, durch den RNAi die Genexpression unterdrückt, ist noch nicht vollständig verstanden. Aus

Untersuchungen an Nicht-Säugerzellen ist bekannt, dass dsRNA-Moleküle durch endogene Ribonukleasen in kleine interferierende RNA-Moleküle (siRNA-Moleküle) umgewandelt werden (Bernstein et al., 2001; Grishok et al., 2001; Hamilton and Baulcombe, 1999; Knight and Bass, 2001; Zamore et al., 2000). Die  
5 21 bis 23 bp langen siRNA-Moleküle sind somit die eigentlichen Mediatoren für den Abbau der mRNA des Zielgens.

Zur spezifischen Hemmung eines Zielgens genügt es, dass das doppelsträngige Oligoribonukleotid eine zum Zielgen identische Sequenz mit einer Länge von 21  
10 bis 23 Nukleotiden (Basenpaaren) aufweist.

In der vorliegenden Erfindung werden doppelsträngige Oligoribonukleotide (dsRNA) verwendet, welche nach der Applikation die Blut/Retina-Schranke überwinden, um durch RNA-Interferenz der korrespondierenden mRNA-Moleküle  
15 die Hemmung der Zielgene in den Zielzellen hervorzurufen. Die vorliegende Erfindung umfasst weiterhin ein Medikament aus dsRNA-Molekülen zur spezifischen Behandlung genetisch bedingter Augenerkrankungen. Mit der vorliegenden Erfindung wird das weite, bislang nicht oder nur unzulänglich adressierbare Therapiefeld von Erkrankungen des Augeninneren und des  
20 Augenhintergrundes erschlossen.

Das in dieser Erfindung beschriebene Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass zum ersten Mal gezeigt werden konnte, dass dsRNA-Moleküle, vorzugsweise in der o.g. Länge nach systemischer oder lokaler Applikation außerhalb des  
25 Augapfels im Inneren des Auges nachweisbar sind. Die Nachweisbarkeit beruht auf der spezifischen Hemmung von vorgegebenen Zielgenen in Zellen oder Geweben des Augeninneren durch RNA-Interferenz.

Aufgrund der spezifischen Funktionen der Zellen des retinalen Gewebes und des  
30 RPE wird vermutet, dass Gene, deren aberrante Funktion ursächlich sind für Krankheiten des Augenhintergrundes, in den Geweben und Zellen des Augenhintergrundes spezifisch exprimiert werden und somit bevorzugte Ziele für medikamentöse Interventionen darstellen.

Der Kern der vorliegenden Erfindung ist insofern überraschend, dass dsRNA-Moleküle einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden in der Lage sind, nach einer systemischen Applikation, beispielsweise durch intravenöse Injektion, die  
5 Blut/Retina-Schranke zu überwinden und in den Geweben des Augenhintergrundes Zielgene spezifisch zu inaktivieren. Diese Überwindung der Blut/Retina-Schranke ist um so bemerkenswerter, da die Überwindung der Blut/Hirn-Schranke durch dsRNA bislang in keinem Experiment gezeigt werden konnte.

10

Das Verfahren, welches unten durch Ausführungsbeispiele erläutert wird, eignet sich somit zur Bereitstellung eines Tiermodells mit den Targets, deren eingeschränkte Funktion für Krankheiten im Auge ursächlich sind, identifiziert und validiert werden können. Das Verfahren eignet sich darüber hinaus zur  
15 spezifischen Intervention in Augenerkrankungen auf molekularer Ebene, ohne dass eine direkte Applikation in den Augenhintergrund notwendig ist. Durch die Spezifität der RNAi zur Hemmung spezifisch in den Zielzellen exprimierter Gene ist das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen gering.

## Ausführungsbeispiele

### Beispiel 1:

- 5 Modellhaft wurde die Inhibition der Expression des grün-fluoreszierenden Proteins (eGFP) im retinalen Pigmentepithel (RPE) von transgenen Mäusen durch dsRNA Moleküle analysiert.

Das Beispiel 1 beschreibt das spezifische *post transcriptional gene silencing* durch dsRNA gegen das Ziel-Gen eGFP im Maus Tiermodell. Für die Durchführung  
10 wurden transgene Mäuse, die die *enhanced* Form des grünfluoreszierenden Proteins (eGFP) in ihren Körperzellen exprimieren, *in vivo* durch systemische Applikation mit dsRNA Oligoribonukleotid-Molekülen gegen das Ziel-Gen eGFP behandelt. Zur Kontrolle erfolgte ebenfalls eine Behandlung mit einem unspezifischen dsRNA Molekül gegen das Luziferase GL2-Gen. Die Expression  
15 des grün-fluoreszierenden Proteins im Auge unbehandelter und behandelter Mäuse wurde immunhistologisch untersucht.

Die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen zeigen, dass unbehandelte und mit unspezifischen dsRNA behandelte Mäuse eGFP in den Zellen des Augenhintergrundes inklusive des retinalen Pigmentepithels  
20 exprimieren. Im Gegensatz dazu ist das eGFP Protein in den Zellen des RPE behandelter Mäuse immunhistologisch nicht mehr nachweisbar. Die Ergebnisse zeigen besonders deutlich, dass systemisch applizierte dsRNA Moleküle die Expression von Proteinen im in den Zellen des Augenhintergrundes und des RPE durch RNA Interferenz unterdrücken. Weiterhin zeigen die Ergebnisse sehr  
25 eindrucksvoll, dass systemisch vorliegende dsRNA Moleküle die Blut/Retina-Schranke überschreiten können und im Augewebe jenseits der Blut/Retina-Schranke ihre Wirkung entfalten können.

dsRNA-Konstrukte und Plasmide:

- 30 Für das Design der dsRNA-Moleküle wurden Sequenzen vom Typ AA(N<sub>19</sub>)TT (wobei N ein beliebiges Nukleotid darstellt) aus der Sequenz der Ziel-mRNA ausgewählt, um 21 Nukleotide (nt) lange Sinn- und Anti-Sinn-Stränge mit symmetrischen zwei Nukleotide langen 3'-Überhängen zu erhalten. In den 3'-

Überhängen wurde 2'-deoxy-Thymidin anstelle von Uridin verwendet. Um zu gewährleisten, dass die dsRNA-Moleküle ausschliesslich gegen das Ziel-Gen gerichtet sind, wurden die ausgewählten dsRNA Sequenzen in einer BLAST-Analyse gegen das Maus Genom getestet. Die 21-nt RNA-Moleküle wurden  
5 chemisch synthetisiert und gereinigt. Für die Duplex-Bildung wurden jeweils 100 µg der Sinn- und Antisinn-Oligoribonukleotide in 10 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl (pH 7,0) gemischt, auf 95°C erwärmt und über einen Zeitraum von 18 Stunden auf Raumtemperatur herabgekühlt. Die dsRNA-Moleküle wurden mit Ethanol präzipitiert und in sterilem dd H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Endkonzentration betrug 0,5  
10 mg/mL. Die Integrität und der Doppelstrang-Charakter der dsRNA wurde durch Gelelektrophorese verifiziert. Alternativ wurden dsRNA-Moleküle von kommerziellen Anbietern bezogen. Die Sequenzen der Ziel-Gene und der entsprechenden dsRNA-Moleküle sind in Fig. 1 dargestellt.

#### 15 Behandlung der Mäuse:

Für die Behandlung wurde transgenen eGFP Mäuse (Okabe et al., 1997) zweimal wöchentlich dsRNA injiziert. Dazu wurden 10 µg dsRNA in einem finalen Volumen von 100 µl sterilem, pyrogen-freien dd H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit einer  
Injektionskanüle in die Schwanzvene der Mäuse injiziert. Kontrolltiere erhielten 10  
20 µg unspezifische Luziferase GL2 dsRNA (siehe Fig. 1) oder 100 µl dd H<sub>2</sub>O. Die Behandlung der Tiere erfolgte über einen Zeitraum von 6 Wochen mit jeweils 2 Injektionen pro Woche. Pro Behandlungsgruppe wurden 5 Tiere untersucht.

#### Untersuchung der eGFP Expression im retinalen Pigmentepithel:

25 Nach der Entnahme wurden die Augen wie folgt fixiert: Die Hornhaut wurde punktiert und das Fixierungsreagenz (4% Paraformaldehyd, in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4) mit einer Injektionsspritze injiziert. Nach 90 Minuten wurde die Linse entfernt und die Fixierung für weitere 60 Minuten fortgesetzt. Die fixierten Präparate wurden anschliessend nach Standardmethoden in einer aufsteigenden  
30 Isopropanolreihe entwässert und über das Intermedium Methylbenzoat in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms wurden standardmäßig 5 bis 7 µm dicke Serienschnitte hergestellt, in einem geheizten Wasserbad gestreckt und auf Objektträger verbracht, die mit Gelatine beschichtet worden waren. Danach

werden die Schnitte über Nacht im Brutschrank bei einer Temperatur von 52 °C getrocknet. Die getrockneten Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert, in eine absteigende Alkoholreihe und anschliessend in Tris/HCl pH 7,4 überführt. Nach dem Blockieren wurden die Schnitte für 2 Stunden mit dem primären anti-eGFP Antiserum (polyklonales Kaninchen anti-eGFP Antiserum, Clontech Nr. 8367) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines sekundären HRP-konjugierten Antikörpers) HRP-anti Kaninchen; DAKO Dänemark) und OPD-Färbung. Nach dem Gegenfärben mit Haemalaun wurden die Proben eingebettet und anschliessend mit einem Axiophot-2 (Zeiss), ausgestattet mit einem 20x und 40x/1.3 Ölobjektiv, mikroskopiert.

#### Beispiel 2:

In dem Beispiel 2 wurde die Expression von zwei Retina- bzw. RPE-spezifisch exprimierten Genen in der Retina von Mäusen nach Applikation spezifischer dsRNA Moleküle analysiert. Bei dem ersten Gen handelt es sich um *Abca4* (*ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1) member 4*), dem homologen Gen zum humanen ABCR Transporter. Das zweite Gen, *Rpe65*, kodiert für das retinale Pigmentepithelium-spezifische 65 kDa Protein (RPE65). Beide Proteine werden spezifisch im Augengewebe exprimiert und stehen in engem Zusammenhang mit retinalen Erkrankungen im Menschen: Stargardt'sche Makuladystrophie (ABCR Transporter; Allikmets et al., 1997; Lewis et al., 1999) bzw. Lebersche Kongenitale Amaurose und rezessive Formen der Retinitis Pigmentosa (RPE65; Seeliger et al., 2001).

Das Beispiel 2 beschreibt das spezifische *post transcriptional gene silencing* des *Abca4*- und *Rpe65*-Gens durch dsRNA im Maus Tiermodell. Für die Durchführung wurde Mäusen *in vivo* durch systemische Applikation mit dsRNA Oligoribonukleotid-Molekülen gegen die Ziel-Gene *Abca4* und *Rpe65* einzeln und in Kombination behandelt. Die Expression der Ziel-Proteine im Auge unbehandelter und behandelter Mäuse wurde anschliessend immunhistologisch untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass unbehandelte oder mit unspezifischen dsRNA Molekülen behandelte Mäuse ABCA4- und RPE65-Protein in den Zellen der Retina exprimieren. Im Gegensatz dazu ist die Expression von

ABCA4 und/oder RPE65 in den RPE Zellen behandelter Mäuse immunhistologisch nicht mehr nachweisbar. Diese Untersuchungen zeigen zum ersten Mal die Möglichkeit einer therapeutischen Intervention in retinalem Gewebe durch *post transcriptional gene silencing* mittels dsRNA. Die systemische Applikation von spezifischen dsRNA Molekülen gegen zwei krankheits-assoziierte Proteine bewirkt die Inhibition der Expression der Proteine im retinalen Gewebe behandelter Mäuse. Die vorliegenden Daten eröffnen die Behandlung retinaler Erkrankungen durch dsRNA Moleküle, wobei die dsRNA Moleküle die Blut/Retina-Schranke überwinden und ihre spezifische Wirkung im Zielgewebe entfalten.

10

#### dsRNA-Konstrukte:

Für das Design der dsRNA-Moleküle wurden Sequenzen vom Typ AA(N<sub>19</sub>)TT (wobei N ein beliebiges Nukleotid darstellt) aus der Sequenz der Ziel-mRNA ausgewählt, um 21 Nukleotide (nt) lange Sinn- und Anti-Sinn-Stränge mit symmetrischen zwei Nukleotide langen 3'-Überhängen zu erhalten. In den 3'-Überhängen wurde zum Teil 2'-deoxy-Thymidin anstelle von Uridin verwendet. Um zu gewährleisten, dass die dsRNA Moleküle ausschliesslich gegen das Ziel-Gen gerichtet sind, wurden die ausgewählten dsRNA Sequenzen in einer BLAST-Analyse gegen das Maus Genom getestet. Die 21-nt RNA-Moleküle wurden chemisch synthetisiert und gereinigt. Für die Duplex-Bildung wurden jeweils 100 µg der Sinn- und Antisinn-Oligoribonukleotide in 10 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl (pH 7,0) gemischt, auf 95°C erwärmt und über einen Zeitraum von 18 Stunden auf Raumtemperatur herabgekühlt. Die dsRNA-Moleküle wurden mit Ethanol präzipitiert und in sterilem dd H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Endkonzentration betrug 0,5 mg/mL. Die Integrität und der Doppelstrang-Charakter der dsRNA wurde durch Gelelektrophorese verifiziert. Alternativ wurden dsRNA-Moleküle von kommerziellen Anbietern bezogen. Die Sequenzen der Ziel-Gene und der entsprechenden dsRNA-Moleküle sind in Fig. 1 dargestellt.

#### 30 Behandlung der Mäuse:

Für die Behandlung wurde Mäusen zweimal wöchentlich dsRNA injiziert. Dazu wurden 10 µg dsRNA (Abca4 oder Rpe65) bzw. 20 µg (Abca4 plus Rpe65) in einem finalen Volumen von 100 µl sterilem, pyrogen-freien dd H<sub>2</sub>O aufgenommen

und mit einer Injektionskanüle in die Schwanzvene der Mäuse injiziert. Kontrolltiere erhielten 10 µg unspezifische Luziferase GL2 dsRNA (siehe Fig. 1) oder 100 µl dd H<sub>2</sub>O. Die Behandlung der Tiere erfolgte über einen Zeitraum von 6 Wochen mit jeweils 2 Injektionen pro Woche. Pro Behandlungsgruppe wurden 5  
5 Tiere untersucht.

Untersuchung der ABCA4 und RPE65 Expression im retinalen Pigmentepithel:  
Nach der Entnahme wurden die Augen wie folgt fixiert: Die Hornhaut wurde punktiert und das Fixierungsreagenz (4% Paraformaldehyd, in 0,1 M  
10 Phosphatpuffer pH 7,4) mit einer Injektionsspritze injiziert. Nach 90 Minuten wurde die Linse entfernt und die Fixierung für weitere 60 Minuten fortgesetzt. Die fixierten Präparate wurden anschliessend nach Standardmethoden in einer aufsteigenden Isopropanolreihe entwässert und über das Intermedium Methylbenzoat in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms wurden standardmäßig 5 bis 7 µm  
15 dicke Serienschnitte hergestellt, in einem geheizten Wasserbad gestreckt und auf Objektträger verbracht, die mit Gelatine beschichtet worden waren. Danach werden die Schnitte über Nacht im Brutschrank bei einer Temperatur von 52 °C getrocknet. Die getrockneten Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert, in eine absteigende Alkoholreihe und anschliessend in Tris/HCl pH 7,4 überführt. Nach  
20 dem Blockieren wurden die Schnitte für 2 Stunden mit dem primären Kaninchen anti-Abca4 Antiserum PrimT1 (Illing et al., 1997) oder anti-Rpe65 (Maus monoklonaler Antikörper; Hamel et al., 1993) Antiserum inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines sekundären HRP-konjugierten Antikörpers) HRP-anti Kaninchen bzw. Maus; DAKO Dänemark) und OPD-Färbung. Nach dem  
25 Gegenfärben mit Haemalaun wurden die Proben eingebettet und anschliessend mit einem Axiophot-2 (Zeiss), ausgestattet mit einem 20x und 40x/1.3 Öbektiv, mikroskopiert.



## Figuren

Fig.1:

5	<i>GFP dsRNA</i>		
	DNA Ziel-Sequenz:	5' CGG CAA GCT GAC CCT GAA GTT CAT	Kodierende Region, 122 - 142 relativ zum ersten Nukleotid des Startkodons (Acc. Nr. X65324)
	dsRNA (Sinn)	5' GCA AGC UGA CCC UGA AGU UCA U	
10	dsRNA (Anti-Sinn)	5' GAA CUU CAG GGU CAG CUU GCC G	
	<i>Luziferase GL2 dsRNA</i>		
	DNA Ziel-Sequenz:	5' AAC GTA CGC GGA ATA CTT CGA	Kodierende Region, 153 - 173 relativ zum ersten Nukleotid des Startkodons (Acc. Nr. X65324)
15	dsRNA (Sinn)	5' CGU ACG CGG AAU ACU UCG Ad(TT)	
	dsRNA (Anti-Sinn)	5' UCG AAG UAU UCC GCG UAC Gd(TT)	
	<i>Rpe65 dsRNA</i>		
20	DNA Ziel-Sequenz:	5' AAC TGT CCT CAC CAC TAA CAG CT	Kodierende Region, 62 - 84 relativ zum ersten Nukleotid des Startkodons (Acc. Nr. NM_02987)
	dsRNA (Sinn)	5' CUG UCC UCA CCA CUA ACA Gd(TT)	
25	dsRNA (Anti-Sinn)	5' CUG UUA GUG GUG AGG ACA Gd(TT)	
	<i>Abca4 dsRNA</i>		
	DNA Ziel-Sequenz:	5' AAG ATT CGC TTT GTA GTG GAA CT	Kodierende Region, 151 - 173 relativ zum ersten Nukleotid des Startkodons (Acc. Nr. NM_007378)
30	dsRNA (Sinn)	5' GAU UCG CUU UGU AGU GGA Ad(TT)	
	dsRNA (Anti-Sinn)	5' UUC CAC UAC AAA GCG AAU Cd(TT)	

## Literatur

Zitierte Literatur, deren Offenbarungsgehalt hiermit in die vorliegende Beschreibung aufgenommen wird:

5

10

15

20

25

30

- Allikmets R. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet.* 17(1):122 (1997).
- Banks CN, Hutton WK. Blindness in New South Wales: an estimate of the prevalence and some of the contributing causes. *Aust J Ophthalmol.* 9:285-288 (1981).
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409(6818):363-6 (2001).
- Bressler NM, Bressler SB. Preventative ophthalmology. Age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 102:1206-1211(1995).
- Caplen N.J., Parrish S., Imani F., Fire A., and Morgan R.A. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:9742-9747 (2001).
- Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., and Tuschel T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498 (2001).
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., and Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Coenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811(1998).
- Gass JD. Drusen and disciform macular detachment and degeneration. *Arch Ophthalmol* 90:206-217 (1973).
- Ghafour IM, Allan D, Foulds WS. Common causes of blindness and visual handicap in the west of Scotland. *Br J Ophthalmol* 67: 209-213 (1983).
- Grey RH, Burns-Cox CJ, Hughes A. Blind and partial sight registration in Avon. *Br J Ophthalmol* 73:88-94(1989).
- Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A,

Ruvkun G, Mello CC. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106(1):23-34(2001).

5 • Hamel CP, Tsilou E, Pfeffer BA, Hooks JJ, Detrick B, Redmond TM. Molecular cloning and expression of RPE65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated in vitro. *J Biol Chem.* 268(21):15751-7(1993).

• Hamilton AJ and Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952(1999).

10 • Heiba IM, Elston RC, Klein BE, Klein R. Sibling correlations and segregation analysis of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Genet Epidemiol* 11:51-67 (1994).

• Hyman LG, Lilienfeld AM, Ferris FL, Fine SL. Senile macular degeneration: a case-control study. *Am J Epidemiol* 118:213-227 (1983).

15 • Hyman L. Epidemiology of eye disease in the elderly. *Eye* 1: 330-341 (1987).

• Illing M., Molday L.L., Molday R.S. The 220-kDa rim protein of retinal rod outer segments is a member of the ABC transporter superfamily. *J Biol Chem.* 11;272(15):10303-10 (1997).

20 • Kasschau KD and Carrington JC. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95:461-470(1998).

• Klein R, Klein BE, Franke T. The relationship of cardiovascular disease and its risk factors to age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 100:406-414 (1993).

25 • Knight SW and Bass BL. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2: 2269-2271(2001).

30 • Leibowitz HM, Krueger DE, Maunder LR, Milton RC, Kini MM, Kahn HA, Nickerson RJ, Pool J, Colton TL, Ganley JP, Loewenstein JI, Dawber TR. The Framingham Eye Study monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults,

1973-1975. *Surv Ophthalmol* 24(Suppl): 335-610 (1980).

- Lewis R.A., Shroyer N.F., Singh N., Allikmets R., Hutchinson A., Li Y., Lupski J.R., Leppert M., Dean M. Genotype/Phenotype analysis of a photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, in Stargardt disease. *Am J Hum Genet.* 1999 Feb;64(2):422-34 (1999).
- Meyers SM, Zachary AA. Monozygotic twins with age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 106:651-653 (1988).
- Okabe, M, Ikawa, M, Kominami, K, Nakanishi, T and Nishimune, Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Letters* 407:313-9 (1997).
- Paetkau ME, Boyd TA, Grace M, Bach-Mills J, Winship B. Senile disciform macular degeneration and smoking. *Can J Ophthalmol* 13:67-71 (1978).
- Piguet B, Wells JA, Palmvang IB, Wormald R, Chisholm IH, Bird AC. Age-related Bruch's membrane change: a clinical study of the relative role of heredity and environment. *Br J Ophthalmol* 77:400-403 (1993).
- Schuler GD. Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. *J Mol Med.* 75(10):694-8 (1997)
- Seddon JM, Ajani UA, Mitchel BD. Familial aggregation of age-related maculopathy. *Am J Ophthalmol* 123: 199-206 (1997).
- Seeliger M.W., Grimm C., Stahlberg F., Friedburg C., Jaissle G., Zrenner E., Guo H., Rème C.E., Humphries P., Hoffmann F., Biel M., Fariss R.N., Redmond T.M., Wenzel A. New views on RPE65 deficiency: the rod system is the source of vision in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *Nat Genet.* 29(1):70-4 (2001).
- Silvestri G, Johnston PB, Hughes AE. Is genetic predisposition an important risk factor in age-related macular degeneration? *Eye* 8:564-568 (1994).
- Sperduto RD, Hiller R. Systemic hypertension and age-related maculopathy in the Framingham Study. *Arch Ophthalmol* 104:216-219 (1986).
- The Eye Disease Case-Control Study Group. Risk factors for neovascular age-related macular. *Arch Ophthalmol* 110:1701-1708 (1992).
- Yap M, Weatherill J. Causes of blindness and partial sight in the Bradford Metropolitan District from 1980 to 1985. *Ophthalmic Physiol Opt* 9:289-292 (1989).
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA

directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 101: 25-33(2000).

## Patentansprüche

EPO - Munich  
29  
18. April 2002

1. Verfahren zur spezifischen Hemmung der Expression vorgegebener Zielgene in Zellen und Geweben des Auges, dadurch gekennzeichnet, dass  
5 ein oder mehrere doppelsträngige Oligoribonukleotide (dsRNA) außerhalb des Retina-Bereichs der Blut/Retina-Schranke appliziert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass

10 a) ein oder mehrere doppelsträngige Oligoribonukleotide (dsRNA) eingeführt werden, welche die RNA-Interferenz der korrespondierenden mRNA von einem oder mehreren der Zielgene vermitteln, so dass die Degradation der korrespondierenden mRNA in der Zelle oder des Gewebes erfolgt, wodurch es zur Bereitstellung einer Zelle oder eines Gewebes kommt, welches eines oder mehrere der eingeführten dsRNA-Moleküle enthält;  
15

b) es zur Aufrechterhaltung der Zelle oder des Gewebes aus a) unter Bedingungen kommt, unter denen die Degradation der mRNA-Moleküle von einem oder mehreren der Zielgene erfolgt, wobei RNA-Interferenz der mRNA-Moleküle der korrespondierenden Zielgene in der Zelle oder  
20 dem Gewebe stattfindet.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet dass

a) ein oder mehrere doppelsträngige Oligoribonukleotide (dsRNA) eingeführt werden, welche die RNA-Interferenz der korrespondierenden  
25 mRNA von einem oder mehreren Gen vermitteln, so dass die Degradation der korrespondierenden mRNA in der Zelle, des Gewebes oder des Organismus erfolgt, wodurch es zur Bereitstellung einer Testzelle, eines Testgewebes oder eines Testorganismus kommt;

b) es zur Aufrechterhaltung der Zelle des Gewebes aus a) unter  
30 Bedingungen kommt, unter denen die Degradation der mRNA-Moleküle von einem oder mehreren der Gene erfolgt, wodurch es zur Bereitstellung einer Testzelle oder eines Testgewebes kommt, in der die mRNA von einem oder mehreren der Gene degradiert ist; und

- 5 c) die Beobachtung des Phänotyps der in b) hergestellten Testzelle oder des Testgewebes möglich ist, und, optional, der Vergleich des beobachteten Phänotyps mit demjenigen einer geeigneten Kontrollzelle oder eines Kontrollgewebes, wodurch Informationen über die Funktionen der Gene möglich sind.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3, dadurch gekennzeichnet eines oder mehrere der Zielgene eine zelluläre mRNA kodieren.
- 10 5. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den genannten Zellen um Zellen aus Geweben des Augenhintergrundes handelt.
- 15 6. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den genannten Zellen um Zellen der Retina handelt.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den genannten Zellen um Zellen des Retinalen Pigmentepithels handelt.
- 20 8. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, dass die in den Ansprüchen 4 bis 9 genannten Zellen und Gewebe einem Wirbeltier zugeordnet werden können.
- 25 9. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, dass die in den Ansprüchen 4 bis 9 genannten Zellen und Gewebe einem Säugetier zugeordnet werden können.
- 30 10. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, dass die in den Ansprüchen 4 bis 9 genannten Zellen und Gewebe dem Menschen zugeordnet werden können.

11. Ein „knockdown“-Organismus, der durch das in Anspruch 2 beschriebene Verfahren hergestellt wurde.
- 5 12. Ein „knockdown“-Organismus aus Anspruch 11, wobei der Organismus eine Augenkrankheit nachbildet.
13. Ein „knockdown“-Organismus aus Anspruch 11, wobei der Organismus eine Krankheit des Augenhintergrundes nachbildet.
- 10 14. Ein „knockdown“-Organismus aus Anspruch 11, wobei der Organismus eine retinale Erkrankung nachbildet.
- 15 15. Ein „knockdown“-Organismus aus Anspruch 11, wobei der Organismus eine degenerative retinale Erkrankung nachbildet.
16. Ein „knockdown“-Organismus aus den Ansprüchen 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Organismus um ein Wirbeltier handelt.
- 20 17. Ein „knockdown“-Organismus aus den Ansprüchen 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Organismus um ein Säugetier handelt.
- 25 18. Medikament bzw. pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung einer Augenerkrankung, dadurch gekennzeichnet, dass die Applikation des Medikamentes außerhalb des Retina-Bereiches der Blut/Retina-Schranke erfolgt.
- 30 19. Medikament nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet dass
  - a) es ein oder mehrere doppelsträngige Oligoribonukleotide (dsRNA) enthält, welche die RNA-Interferenz der korrespondierenden mRNA von einem oder mehreren Zielgenen vermitteln, deren eingeschränkte Funktionen für eine Augenerkrankung ursächlich sind;



- b) es zur Aufrechterhaltung der RNA-Interferenz aus a) unter Bedingungen kommt, unter denen die Degradation der mRNA-Moleküle von einem oder mehreren der für die Augenerkrankung ursächlichen Zielgene erfolgt.

5

20. Medikament nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet dass

- a) es ein oder mehrere doppelsträngige Oligoribonukleotide (dsRNA) enthält, welche die RNA-Interferenz der korrespondierenden mRNA von einem oder mehreren Zielgenen vermitteln, wodurch der negative Effekt eines oder mehrerer in ihrer Funktion eingeschränkter Gene, die für eine Augenerkrankung ursächlich sind, effizient ausgeglichen wird;
- b) es zur Aufrechterhaltung der RNA-Interferenz aus a) unter Bedingungen kommt, unter denen die Degradation der mRNA-Moleküle von einem oder mehreren Zielgenen erfolgt, wodurch der negative Effekt eines oder mehrerer in ihrer Funktion eingeschränkter Gene, die für eine Augenerkrankung ursächlich sind, effizient ausgeglichen wird.

10

15

21. Medikament nach den Ansprüchen 19 und 20 zur Behandlung einer Krankheit des Augenhintergrundes.

20

22. Medikament nach den Ansprüchen 19 und 20 zur Behandlung einer retinalen Erkrankung.

25

23. Medikament nach den Ansprüchen 19 und 20 zur Behandlung einer degenerativen retinalen Erkrankung.

24. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der Zielgene spezifisch im Auge exprimiert werden.

30

25. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der Zielgene spezifisch in Geweben des Augenhintergrundes exprimiert werden.

26. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der Zielgene spezifisch in der Retina exprimiert werden.
- 5 27. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der Zielgene spezifisch im Retinalen Pigmentepithel exprimiert werden.
- 10 28. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der verwendeten dsRNA-Moleküle zwischen 21 und 23 Nukleotiden lang sind.
- 15 29. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der verwendeten dsRNA-Moleküle eine terminale 3'-Hydroxylgruppe enthalten.
- 20 30. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der verwendeten dsRNA-Moleküle chemisch synthetisiert wurde.
- 25 31. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der verwendeten dsRNA-Moleküle ein Analog einer natürlich vorkommenden RNA darstellt.
- 30 32. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der verwendeten dsRNA-Moleküle sich unterscheidet von dem entsprechenden dsRNA-Analagon aus den Ansprüchen 23 bis 26 durch die Addition, Deletion, Substitution oder der Modifikation eines oder mehrerer Nukleotide.
33. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der verwendeten dsRNA-Moleküle das korrespondierende Gen durch „transcriptional silencing“ hemmt.

34. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der verwendeten dsRNA-Moleküle durch einen Vektor kodiert wird.
- 5 35. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 und den Ansprüchen 19 bis 23, wobei eines oder mehrere der dsRNA-Moleküle durch einen geeigneten Carrier in Zellen oder Geweben des Auges eingebracht werden, dadurch gekennzeichnet, dass die Applikation außerhalb der Blut/Retina-Schranke erfolgt.
- 10 36. Verfahren nach Anspruch 35, wobei es sich bei dem Carrier um Adeno-assoziiertes Virus (AAV) handelt.
- 15 37. Verfahren nach Anspruch 35, wobei der Carrier dadurch gekennzeichnet ist, dass
- a) beispielsweise eine Verpackung der dsRNA in micellare Strukturen, vorzugsweise Liposomen, vorliegt;
  - b) beispielsweise eine Bindung der dsRNA an kationische Porphyrine, kationische Polyamine, polymere DNA-bindende Kationen oder fusogene Peptide, vorliegt;
  - 20 c) beispielsweise eine Assoziation oder Verpackung der dsRNA in ein von einem Virus wie das Cytomegalovirus (CMV) abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes Hüllprotein vorliegt.
- 25 38. Verfahren nach Anspruch 35, wobei die dsRNA an eine Kombination der in Anspruch 37 beispielhaft genannten Träger gebunden vorliegt.
- 30 39. Verfahren nach Anspruch 35, wobei die dsRNA an eine Kombination der in Anspruch 37 beispielhaft genannten Träger und an das Adeno-assoziierte Virus (AAV) gebunden vorliegt.
40. Verfahren nach den Ansprüchen 35 bis 39, wobei der Carrier so gewählt wurde, dass die dsRNA-Moleküle nach der Applikation über einen

definierten Zeitraum kontinuierlich in das Zielgewebe oder die Zielzellen eingebracht werden.

- 5 41. Verfahren nach den Ansprüchen 35 bis 40, wobei es sich bei den genannten Zielzellen um Zellen des Augenhintergrundes handelt.
42. Verfahren nach den Ansprüchen 35 bis 40, wobei es sich bei den genannten Zielzellen um Zellen der Retina handelt.
- 10 43. Verfahren nach den Ansprüchen 35 bis 40, wobei es sich bei den genannten Zielzellen um Zellen des Retinalen Pigmentepithels handelt.
- 15 44. Verfahren nach den Ansprüchen 35 bis 40, wobei es sich bei dem genannten Zielgewebe um ein Gewebe des Augenhintergrundes handelt.
45. Verfahren nach den Ansprüchen 31 bis 40, wobei es sich bei dem genannten Zellen und Geweben um Zellen und Gewebe eines Wirbeltieres handelt.
- 20 46. Verfahren nach den Ansprüchen 35 bis 45, wobei es sich bei dem genannten Zellen und Geweben um Zellen und Gewebe eines Säugetieres handelt.
- 25 47. Verfahren nach den Ansprüchen 35 bis 45, wobei es sich bei dem genannten Zellen und Geweben um menschliche Zellen und Gewebe handelt.
- 30 48. Jeweils mindestens eine Komponente, ausgewählt aus der Gruppe umfassend: pharmazeutische Zusammensetzung, Nukleinsäure, Organismus, Wirt, Zelle, Zelllinie, Gewebe, Organ, Medikament, Träger und/oder Vektor zur spezifischen Hemmung der Expression vorgegebener Zielgene in Zellen und Geweben des Auges, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein oder mehrere doppelsträngige Oligoribonukleotide (dsRNA)

aufweist/aufweisen, die außerhalb des Retina-Bereichs der Blut/Retina-Schranke applizierbar ist.

- 5 49. Verwendung von jeweils mindestens einer Komponente der folgenden Gruppe, umfassend: pharmazeutische Zusammensetzung, Nukleinsäure, Organismus, Wirt, Zelle, Zelllinie, Gewebe, Organ, Medikament, Träger und/oder Vektor zur spezifischen Hemmung der Expression vorgegebener Zielgene in Zellen und Geweben des Auges.
- 10 50. Komponente nach Anspruch 48 oder Verwendung einer Komponente nach Anspruch 49 nach einer oder mehreren Ausführungsformen der Beschreibung.
- 15 51. Verfahren zur Identifizierung einer pharmazeutischen Zusammensetzung mit den Schritten: Bereitstellen jeweils mindestens einer Komponente der folgenden Gruppe, umfassend: Nukleinsäure, Organismus, Wirt, Zelle, Zelllinie, Gewebe, Organ, Träger und/oder Vektor zur spezifischen Hemmung der Expression vorgegebener Zielgene in Zellen und Geweben des Auges, derart, dass ein oder mehrere doppelsträngige
- 20 Oligoribonukleotide (dsRNA) außerhalb des Retina-Bereichs der Blut/Retina-Schranke applizierbar sind.
52. Verwendung der RNA-Interferenz-Methode zur Therapie des Auges.
- 25 53. Verwendung jeweils mindestens einer Komponente der folgenden Gruppe, umfassend: Nukleinsäure, Organismus, Wirt, Zelle, Zelllinie, Gewebe, Organ, Träger und/oder Vektor zur Therapie des Auges mittels RNA-Interferenz-Methode.